

REC'D 08 JAN 1999

WIPO PCT

09/555387

PRIORITY DOCUMENT



Bescheinigung

Die Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien in Düsseldorf/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Verwendung von Wirkstoffmischungen zur Herstel-
lung von hypocholesterinämischen Mitteln"

am 14. November 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wieder-
gabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Sym-
bole A 61 K und A 23 L der Internationalen Patentklassifika-
tion erhalten.

München, den 7. Juli 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

[Signature]
Schulenburg

Aktenzeichen: 197 50 453.1

Patentanmeldung
 H 3185

Verwendung von Wirkstoffmischungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln

11. November 1997

Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von synergistischen Mischungen aus Phytosterolen bzw. Phytosterolestern und konjugierten Fettsäuren zur Herstellung von Mitteln zur Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern.

Stand der Technik

Unter hypocholesterinämischen Wirkstoffen werden Mittel verstanden, die zu einer Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum von Warmblütern führen, ohne daß dadurch eine Hemmung oder Verringerung der Bildung von Cholesterin im Blut eintritt. Für diesen Zweck wurden bereits von Peterson et al. in *J.Nutrit.* **50, 191 (1953)** Phytosterole, also pflanzliche Stenole, und deren Ester mit Fettsäuren vorgeschlagen. In die gleiche Richtung weisen auch die Patentschriften **US 3,089,939**, **US 3,203,862** sowie die deutsche Offenlegungsschrift **DE-OS 2035069** (Procter & Gamble). Die Wirkstoffe werden üblicherweise Brat- oder Speiseölen zugesetzt und dann über die Nahrung aufgenommen, wobei die Einsatzmengen jedoch in der Regel gering sind und üblicherweise unter 0,5 Gew.-% liegen, um zu verhindern, daß die Speiseöle eintrüben oder die Stenole bei Zusatz von Wasser ausgefällt werden. Für den Einsatz im Nahrungsmittelbereich, in Kosmetika, pharmazeutischen Zubereitungen und im Agrarsektor werden in der europäischen Patentanmeldung **EP-A1 0289636** (Ashai) lagerstabile Emulsionen der Stenolester in Zucker- oder Polyglycerinestern vorgeschlagen. Die Einarbeitung von Sitostanolestern zur Verminderung des Blutcholesteringehaltes in Margarine, Butter, Mayonnaise, Salatsaucen und dergleichen wird in der Europäischen Patentschrift **EP-B1 0594612** (Raisio) vorgeschlagen.

Von Nachteil ist jedoch, daß die Phytosterolester den Nahrungsmitteln üblicherweise nur in geringen Mengen zugesetzt werden können, da ansonsten die Gefahr besteht, daß sie den Geschmack und/oder die Konsistenz der Mittel beeinträchtigen. Zur nachhaltigen Beeinflussung des Cholesteringe-

haltes im Blut wäre jedoch die Aufnahme größerer Mengen Phytostenole bzw. Phytostenolester wünschenswert. Weiterhin verbesserungswürdig ist die Geschwindigkeit, mit der die Stoffe den Gehalt an Cholesterin im Serum vermindern. Die Aufgabe der Erfindung hat folglich darin bestanden, diesen Mängeln abzuhelpen.

Beschreibung der Erfindung

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Wirkstoffmischungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln mit der Maßgabe, daß man

- (a) Phytostenole und/oder Phytostenolester und
- (b) Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen bzw. deren Glyceride

einsetzt.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß Mischungen von Phytostenolen bzw. Phytostenolestern mit konjugierten Fettsäuren bzw. Fettsäureglyceriden in synergistischer Weise die Verminderung des Cholesteringehaltes im Blutserum bewirken. In Gelatine verkapselt oder Nahrungsmitteln direkt zugesetzt, lassen sich sowohl die Wirkstoffgemische problemlos oral einnehmen.

Phytostenole und Phytostenolester

Unter Phytostenolen (oder synonym Phytosterolen) sind pflanzliche Steroide zu verstehen, die nur am C-3 eine Hydroxylgruppe, sonst aber keine funktionellen Gruppen tragen. In der Regel besitzen die Phytostenole 27 bis 30 Kohlenstoffatome und eine Doppelbindung in 5/6, gegebenenfalls 7/8, 8/9 oder anderen Positionen. Neben diesen ungesättigten Spezies kommen als Stenole auch die durch Härtung erhältlichen gesättigten Verbindungen in Frage, die als Stanole bezeichnet werden und von der vorliegenden Erfindung mitumschlossen werden. Typische Beispiele für geeignete Phytostenole sind beispielsweise Ergostenole, Campestenole, Stigmastenole, Brassica-stenole sowie vorzugsweise Sitostenole bzw. Sitostanole und insbesondere β -Sitostenole bzw. β -Sitostanole. Neben den genannten Phytostenolen werden vorzugsweise deren Ester eingesetzt. Die Säurekomponente der Esters kann auf Carbonsäuren der Formel (I) zurückgehen,



(I)

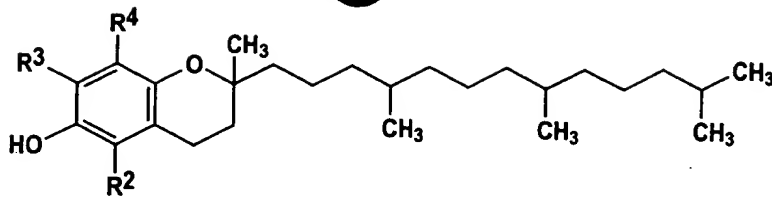
in der R¹CO für einen aliphatischen, linearen oder verzweigten Acylrest mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen und 0 und/oder 1, 2 oder 3 Doppelbindungen steht. Typische Beispiele sind Essigsäure, Propionsäure, Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure, Caprylsäure, 2-Ethylhexansäure, Caprinsäure, Laurinsäure, Isotridecansäure, Myristinsäure, Palmitinsäure, Palmoleinsäure, Stearinsäure, Isostearinsäure, Ölsäure, Elaidinsäure, Petroselinssäure, Linolsäure, Linolensäure, Elaeostearinsäure, Arachinsäure, Gadoleinsäure, Behensäure und Erucasäure sowie deren technische Mischungen, die z.B. bei der Druckspaltung von natürlichen Fetten und Ölen, bei der Reduktion von Aldehyden aus der Roelen'schen Oxosynthese oder der Dimerisierung von ungesättigten Fettsäuren anfallen. Bevorzugt sind technische Fettsäuren mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen wie beispielsweise Kokos-, Palm-, Palmkern- oder Talgfettsäure. Besonders bevorzugt ist der Einsatz von Estern des β -Sitostenols bzw. β -Sito- stanols mit Fettsäuren mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen. Diese Ester können sowohl durch direkte Ver- esterung der Phytostenole mit den Fettsäuren oder aber durch Umesterung mit Fettsäureniedrig- alkylestern oder Triglyceriden in Gegenwart geeigneter Katalysatoren, wie z.B. Natriumethylat oder speziell auch Enzymen hergestellt werden [vgl. **EP-A2 0195311** (Yoshikawa)]. Die hypocho- lesterinämische Wirkung von Phytostenolen bzw. Phytostenolestern ist beispielsweise aus der Euro- päischen Patentschrift **EP-B1 0594612** (Raisio) sowie der dort zitierten Literatur bekannt.

Konjugierte Fettsäuren

Unter dem Begriff konjugierte Fettsäuren versteht man aliphatische Carbonsäuren mit 6 bis 24, vorzugsweise 16 bis 18 Kohlenstoffatomen und mindestens zwei Doppelbindungen, die sich zueinan- der in Konjugation befinden, d.h. durch genau eine Einfachbindung voneinander getrennt sind. Typi- sche Beispiele sind die konjugierte Linolsäure (CLA) oder konjugierte Fischfettsäuren. Von konjugierter Linolsäure ist bekannt, daß sie eine geringe hypocholesterinämische Wirkung besitzt; ihre Verwendung in Lebensmitteln oder als Lebensmittelergänzungsstoff geht aber darauf zurück, daß sie die Verbren- nung von körpereigenen Fetten unterstützt [vgl. **EP-B1 0579901**, **WO 94/16690**, **WO 96/06605**; (WARF)]. Anstelle der konjugierten Fettsäuren können aus geschmacklichen Gründen und wegen der besseren Fettlöslichkeit auch die entsprechenden Voll- oder Partialester mit Glycerin eingesetzt werden.

Tocopherole

Als weitere Bestandteile können die Wirkstoffgemische Potenzierungsmittel vom Typ der Tocopherole enthalten. Unter Tocopherolen werden in 2-Stellung mit 4,8,12-Trimethyltridecyl-Resten substituierte Chroman-6-ole (3,4-Dihydro-2-H-1benzopyran-6-ole) verstanden, die der Formel (II) folgen,

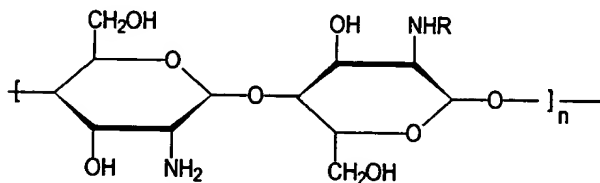


(II)

in der R^2 , R^3 und R^4 unabhängig voneinander für Wasserstoff oder eine Methylgruppe stehen. Tocopherole zählen zu den Biochinonen, also polyprenylierten 1,4-Benzo- bzw. Naphthochinonen, deren Prenylketten mehr oder weniger stark gesättigt sind. Typische Beispiele für Tocopherole, die im Sinne der Erfindung als Komponente (b) in Betracht kommen, sind Ubichinone, Bovichinone, K-Vitamine und/oder Menachinone (2-Methyl-1,4-Naphthochinone). Man unterscheidet bei den Tocopherolen weiterhin α -, β -, γ -, δ - und ϵ -Tocopherole, wobei letztere noch über die ursprüngliche ungesättigte Prenylseitenkette verfügen, sowie α -Tocopherolchinon und -hydrochinon, bei denen das Pyran-Ringsystem geöffnet ist. Vorzugsweise wird als Komponente (b) α -Tocopherol (Vitamin E) der Formel (II) eingesetzt, bei der R^2 , R^3 und R^4 für Methylgruppen stehen, oder Ester des α -Tocopherols mit Carbonsäuren mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen, wie beispielsweise α -Tocopherolacetat oder α -Tocopherolpalmitat.

Chitosane

Als weitere Bestandteile können die Wirkstoffgemische Potenzierungsmittel vom Typ der Chitosane enthalten. Chitosane stellen Biopolymere dar und werden zur Gruppe der Hydrokolloide gezählt. Chemisch betrachtet handelt es sich um partiell deacetylierte Chitine unterschiedlichen Molekulargewichtes, die den folgenden - idealisierten - Monomerbaustein (III) enthalten:



(III)

Im Gegensatz zu den meisten Hydrokolloiden, die im Bereich biologischer pH-Werte negativ geladen sind, stellen Chitosane unter diesen Bedingungen kationische Biopolymere dar. Die positiv geladenen Chitosane können mit entgegengesetzt geladenen Oberflächen in Wechselwirkung treten und werden daher in kosmetischen Haar- und Körperpflegemitteln sowie pharmazeutischen Zubereitungen eingesetzt (vgl. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Ed., Vol. A6, Weinheim,**

Verlag Chemie, 1986, S. 231-332). Übersichten zu diesem Thema sind auch beispielsweise von B.Gesslein et al. in **HAPPI** 27, 57 (1990), O.Skaugrud in **Drug Cosm.Ind.** 148, 24 (1991) und E.Onsoyen et al. in **Seifen-Öle-Fette-Wachse** 117, 633 (1991) erschienen. Zur Herstellung der Chitosane geht man von Chitin, vorzugsweise den Schalenresten von Krustentieren aus, die als billige Rohstoffe in großen Mengen zur Verfügung stehen. Das Chitin wird dabei in einem Verfahren das erstmals von Hackmann et al. beschrieben worden ist, üblicherweise zunächst durch Zusatz von Basen deproteiniert, durch Zugabe von Mineralsäuren demineralisiert und schließlich durch Zugabe von starken Basen deacetyliert, wobei die Molekulargewichte über ein breites Spektrum verteilt sein können. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise aus **Makromol.Chem.** 177, 3589 (1976) oder der französischen Patentanmeldung **FR-A 2701266** bekannt. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein Chitinabbauprodukt, wie es in der Internationalen Patentanmeldung **WO 96/16991** (Henkel) beschrieben wird, oder dessen Abbauprodukt mit Wasserstoffperoxid eingesetzt.

Phytostenolsulfate

Als weitere Bestandteile können die Wirkstoffgemische Potenzierungsmittel vom Typ der Phytostenolsulfate enthalten. Phytostenolsulfate stellen bekannte Stoffe dar, die beispielsweise durch Sulfatierung von Phytostenolen mit einem Komplex aus Schwefelttrioxid und Pyridin in Benzol hergestellt werden können [vgl. **J.Am. Chem.Soc.** 63, 1259 (1941)]. Typische Beispiele sind die Sulfate von Ergostenolen, Campestenolen, Stigmastenolen und Sitostenolen. Die Phytostenolsulfate können als Alkali- und/oder Erdalkalimetallsalze, als Ammonium-, Alkylammonium-, Alkanolammonium- und/oder Glucamoniumsalze vorliegen. In der Regel werden sie in Form ihrer Natriumsalze eingesetzt.

(Desoxy)Ribonucleinsäuren

Als weitere Bestandteile können die Wirkstoffgemische schließlich Potenzierungsmittel vom Typ der (Desoxy)Ribonucleinsäuren enthalten. Unter (Desoxy)Ribonucleinsäuren (DNA bzw. RNA) werden hochmolekulare, fadenförmige Polynucleotide verstanden, die sich von 2'-Desoxy- β -D-ribonucleosiden bzw. D-Ribonucleosiden ableiten, die ihrerseits wieder von äquivalenten Mengen einer Nucleobase und der Pentose 2-Desoxy-D-ribo-furanose bzw. D-Ribofuranose aufgebaut werden. Als Nucleobasen können die DNA bzw. RNA die Purinderivate Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Thymin bzw. Uracil enthalten. In den Nucleinsäuren sind die Nucleobasen N-glykosidisch mit Kohlenstoffatom 1 der Ribose, wodurch im Einzelfall Adenosine, Guanosine, Cytidine und Thimidine entstehen. In den Säuren verknüpft eine Phosphatgruppe die 5'-Hydroxygruppe der Nucleoside mit der 3'-OH-Gruppe der jeweils folgenden durch eine Phosphodiesterbrücke unter Ausbildung von Einzel-

strang-DNA bzw. -RNA. Wegen des großen Verhältnisses von Länge zu Durchmesser neigen DNA- bzw. RNA-Moleküle schon bei mechanischer Beanspruchung, etwa bei der Extraktion, zu Strangbruch. Aus diesem Grunde kann das Molekulargewicht der Nucleinsäuren 10^3 bis 10^9 Dalton reichen. Im Sinne der Erfindung werden konzentrierte DNA bzw. RNA-Lösungen eingesetzt, die sich durch ein flüssig-kristallines Verhalten auszeichnen. Vorzugsweise werden Desoxy- bzw. Ribonucleinsäuren eingesetzt, die aus marinen Quellen beispielsweise durch Extraktion von Fischsperma erhalten werden und die ein Molekulargewicht im Bereich von 40.000 bis 1.000.000 Dalton aufweisen.

Gewerbliche Anwendbarkeit

Die Wirkstoffmischungen der Erfindung können die Phytostenole und/oder Phytostenolester und die konjugierten Fettsäuren im Gewichtsverhältnis 99 : 1 bis 1 : 99, vorzugsweise 90 : 10 bis 10 : 90, insbesondere 70 : 25 bis 25 : 75 und besonders bevorzugt 60 : 40 bis 40 : 60 enthalten. In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung werden die Wirkstoffmischungen in an sich bekannter Weise in Gelatine verkapselt, wobei man die Komponenten (a) und (b) jeweils in Mengen von 0,1 bis 50, vorzugsweise 1 bis 30, insbesondere 5 bis 25 und besonders bevorzugt 10 bis 15 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatinekapseln - einsetzt. Daneben ist es möglich, die Mischungen in üblichen Nahrungsmitteln zu lösen bzw. zu dispergieren, als da beispielsweise sind : Butter, Margarine, Diätnahrung, Fritieröle, Speiseöle, Mayonnaisen, Salatdressings, Kakaoprodukte, Wurst und dergleichen.

Beispiele

Beispiele 1 bis 5, Vergleichsbeispiele V1 bis V5

Es wurden Gelatinekapseln (Gewicht ca. 1,5 g) mit einem Gehalt von 5 bzw. 10 Gew.-% β -Sitostenol bzw. β -Sitostenolester und gegebenenfalls 5 bzw. 10 Gew.-% konjugierte Linolsäure (CLA) sowie 0,5 Gew.-% radioaktiv markiertem Cholesterin hergestellt. Zur Untersuchung der hypocholesterinämischen Wirkung ließ man männliche Ratten (Einzelgewicht ca. 200 g) über Nacht fasten. Am folgenden Tag wurde den Versuchstieren jeweils eine zerkleinerte Gelatinekapsel mit etwas kochsalzhaltigem Wasser über eine Magensonde eingeführt. Nach 3, 6, 12, 24 und 48 h wurde den Tieren Blut abgenommen und der Gehalt an radioaktivem Cholesterin bestimmt. Die Ergebnisse, die den Mittelwert der Messungen von 10 Versuchstieren darstellen, sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Angaben zur Abnahme der Radioaktivität verstehen sich jeweils in Bezug auf eine Blindgruppe von Versuchstieren, denen lediglich Gelatinekapseln mit einem Gehalt von 20 Gew.-% Vitamin E und einer entsprechenden Menge radioaktiv markiertem Cholesterin verabreicht worden war. Die Mischungen 1 bis 5 sind erfindungsgemäß, die Mischungen V1 bis V5 dienen dem Vergleich.

Tabelle 1

Hypocholesterinämische Wirkung (Mengenangaben als Gew.-% bezogen auf Gelatinekapsel)

Zusammensetzung	1	2	3	4	5	V1	V2	V3	V4	V5
β -Sitostenol	5	-	-	-	-	10	-	-	-	-
β -Sitostanol	-	5	-	-	-	-	10	-	-	-
Laurinsäure- β -sitostenolester	-	-	5	-	-	-	-	10	-	-
Laurinsäure- β -sitostanolester	-	-	-	5	10	-	-	-	10	-
Konjugierte Linolsäure	5	5	5	5	5	-	-	-	-	10
Radioaktivität [%-rel]										
- nach 3 h	93	93	93	93	93	93	93	93	93	98
- nach 6 h	84	83	83	83	81	87	86	87	86	91
- nach 12 h	75	75	75	74	71	79	79	78	78	87
- nach 24 h	54	51	47	45	40	62	60	59	69	75
- nach 48 h	23	21	22	19	12	35	32	35	32	60

Die Beispiele zeigen die synergistische Abnahme des Cholesteringehaltes im Blut bei Einsatz von Mischungen der Stenole bzw. Stenolester mit CLA.

Patentansprüche

1. Verwendung von Wirkstoffmischungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln, **dadurch gekennzeichnet**, daß man
 - (a) Phytostenole und/oder Phytostenolester und
 - (b) Fettsäuren mit 6 bis 24 Kohlenstoffatomen und mindestens zwei konjugierten Doppelbindungen bzw. deren Glyceride
 einsetzt.
2. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Komponente (a) β -Sitostenol, β -Sitostanol oder deren Ester einsetzt.
3. Verwendung nach den Ansprüchen 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Komponente (a) Ester von β -Sitostenol bzw. β -Sitostanol mit Carbonsäuren der Formel (I) einsetzt,

$$R^1CO-OH$$

(I)

in der R^1CO für einen aliphatischen, linearen oder verzweigten Acylrest mit 2 bis 22 Kohlenstoffatomen und 0 und/oder 1, 2 oder 3 Doppelbindungen steht.
4. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Komponente (a) Ester von β -Sitostenol bzw. β -Sitostanol mit Fettsäuren mit 12 bis 18 Kohlenstoffatomen einsetzt.
5. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 4, **dadurch gekennzeichnet**, daß man als Komponente (b) konjugierte Linolsäure (CLA) einsetzt.
6. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und (b) im Gewichtsverhältnis 99 : 1 bis 1 : 99 einsetzt.
7. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und (b) in Gelatine verkapselt.

8. Verwendung nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und (b) jeweils in Mengen von 0,1 bis 50 Gew.-% - bezogen auf das Gewicht der Gelatinekapseln - einsetzt.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 1 bis 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und (b) Lebensmitteln zusetzt.
10. Verwendung nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß man die Komponenten (a) und (b) in Butter, Margarine, Diätnahrung, Fritierölen, Speiseölen, Mayonnaisen, Salatdressings, Kakao-
produkten, Wurst und dergleichen dispergiert.



Verwendung von Wirkstoffmischungen zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln

Zusammenfassung

Zur Herstellung von hypocholesterinämischen Mitteln wird die Verwendung von Wirkstoffmischungen vorgeschlagen, enthaltend (a) Phytosterole und/oder Phytosterolester und (b) konjugierten Fettsäuren. Die Mischungen weisen einen synergistischen Effekt bei der Verminderung des Cholesteringehaltes im Serum auf. Durch Verkapselung in Gelatine lassen sich die Mittel problemlos auch oral in höheren Dosen verabreichen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)